Aus dem Institut für Hirnforschung
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. J. Peiffer

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER SULFATIDE IM GEHIRN VON 19 – 22 WOCHEN ALTEN FETEN: KEINE VERMEHRUNG BEI METACHROMATISCHER LEUKODYSTROPHIE

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von

Dipl. Biochem. Wolfgang Baier
aus Hohenlimburg

1982

Aus dem Institut für Hirnforschung
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. J. Peiffer

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER SULFATIDE IM GEHIRN VON 19 – 22 WOCHEN ALTEN FETEN: KEINE VERMEHRUNG BEI METACHROMATISCHER LEUKODYSTROPHIE

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von

Dipl. Biochem. Wolfgang Baier
aus Hohenlimburg

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. med. Dr. rer. nat. H. Ritter
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. K. Harzer
2. Berichterstatter:	Professor Dr. rer. nat. K. Reutter

---

gedruckt bei H.- J. Köhler , Reprografischer Betrieb , Tübingen

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	4
2.1.	Säulenchromatographische Gewinnung von Sulfatid aus Gehirnlipidextrakt bei MLD^{+} und Kontrolle	4
2.2.	Dünnschichtchromatographische Analyse (DC^{++})	6
2.3.	Densitometrie	6
2.4.	Metachromasie-Test	7
2.5.	Cerebrosid-Nachweis	7
2.6.	Cerebrosid- und Sulfatid-Hydrolyse	8
3.	Ergebnisse	8
3.1.	Säulenchromatographische Gewinnung von Sulfatid aus Gehirnlipidextrakt	8
3.2.	Dünnschichtchromatographische Analyse	9
3.3.	Densitometrie	9
3.4.	Metachromasie-Reaktion	10
3.5.	Cerebrosid-Nachweis	10
3.6.	Cerebrosid- und Sulfatid-Hydrolyse	11
3.6.1.	Hydrolyse der Cerebroside	11
3.6.2.	Hydrolyse der Sulfatide	11
3.6.3.	Hydrolyse der Glukose- und der Galaktose-Referenzen	12
4.	Diskussion	12
5.	Zusammenfassung	19
6.	Literaturverzeichnis	20
	Legenden zu den Abbildungen	24
	Abbildungen	25

$^{+}$Abkürzung für "Metachromatische Leukodystrophie"

$^{++}$Abkürzung für "Dünnschicht-Chromatographie"

1. Einleitung

Die Metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit (Frequenz ca. 1 : 40.000), die mit primärer Entmarkung des zentralen und peripheren Nervensystems einhergeht (3). Die häufigste, spätinfantile Verlaufsform beginnt meist im 2. Lebensjahr. Der neurodegenerative Prozess bei spätinfantiler MLD mit Symptomen wie Gangunsicherheit, Muskelhypotonie, später verlangsamter Nervenleitgeschwindigkeit, Demenz, tonischen Krämpfen, Opticusatrophie, Quadriparese führt meist vor dem 5. Lebensjahr zum Tode.

Eine kausale Therapie ist nicht bekannt.

Pathogenetisch ist die MLD durch eine Speicherung von Sulfatiden (Sulfolipiden) in den myelinbildenden Zellen (Oligodendroglia, Schwann'sche Zelle) mit anschließendem Myelinzerfall zu erklären. Biochemisch ist die Sulfatid-Speicherung am deutlichsten in den Bezirken der degenerierenden oder degenerierten weißen Hirnsubstanz nachzuweisen (1).

Sulfatide sind Schwefelsäureester der neutralen Glykosphingolipide. Sie leiten sich ab (vgl. im folgenden jeweils Abb. 1) vom Sphingosin (= Amino-dialkohol). Sphingosin wird durch Veresterung mit einer Fettsäure umgewandelt zu Ceramid. Ceramid ist ein Säureamid und stellt den Lipidanteil des Sulfatids dar. Durch Reaktion der CH_2OH-Gruppe des Ceramids mit

der OH-Gruppe an C-1 von Galaktose entsteht Galaktocerebrosid. Der Sulfatrest wird an das C-3 der Galaktose angelagert.

Die Sulfatide reagieren mit bestimmten Farbstoffen (z.B. essigsaures Kresylviolett, Pseudoisocyanin oder Toluidinblau) metachromatisch, d.h. an einer Micelle aus sauren Lipidmolekülen lagert sich der kationische Farbstoff unter Änderung seiner Lichtabsorption an. Von dieser Eigenschaft der krankheitsspezifischen Speichersubstanz her hat die Erkrankung ihren Namen (2,5).

Die Speicherung der Sulfatide beruht auf einem genetisch bedingten Defekt des lysosomalen Enzyms Cerebrosid-Sulfatase (Arylsulfatase A, ASA, EC 3.1.6.1).

SO_3H-Gal-Cer ⟶ Gal-Cer

Bei konstanter Neusynthese und gestörtem Abbau führt so der große Überschuß von Sulfatiden wohl über eine Instabilität der Myelinmembran zum Markzerfall.

Da die ASA als lysosomale Hydrolase in allen Zellen vorkommt, ist eine Diagnose der MLD möglich aus Leukozyten, Fibroblasten und insbesondere aus fetalen Zellen des Fruchtwassers, wodurch eine pränatale Diagnose möglich ist (4). Die Fruchtwasserzellen stammen von der Amnionhülle, der Haut, aus dem Nasen-Rachen-Raum und dem Harnwegssystem des Feten und lassen sich in der 15.-16. Schwangerschaftswoche durch Fruchtwasserpunktion (Amniocentese) gewinnen (9). Nach der Zellkultivierung in vitro kann dann im Falle der MLD die ASA-Aktivität

der Zellen z.B. mit 2-Hydroxy-5-Nitrophenyl-Sulfat (p-Nitrocatecholsulfat) bestimmt werden. Ist der Fet homozygot für ein Defektallel $ASA^{\square}$ der ASA, so wird die Schwangerschaft bei Einverständnis der Eltern durch induzierten Abort beendet.

So eröffnet sich die Möglichkeit, an den abortierten Feten Frühstadien der MLD zu untersuchen. Die biochemische Analyse der fetalen Gewebe richtet sich 1. auf die Bestätigung des Enzymdefekts, dessen Nachweis aus den Amnionzellen zu der pränatalen Diagnose geführt hatte, und 2. auf vielleicht bereits vorhandene Auswirkungen des Enzymdefekts auf Substratebene: Sind Lipidsubstrate der ASA, also Sulfatide, bereits vermehrt nachweisbar?

HARZER et al. (8) beschrieben bei einem 21 Wochen alten Feten mit MLD eine leichte Sulfatidvermehrung im Gehirn und eine deutliche in der Niere (s. Diskussion).

Diese Befunde wurden später überprüft (14). Der Befund im Gehirn konnte nicht, derjenige in der Niere jedoch bestätigt werden.

Das Problem des biochemischen Sulfatidnachweises im fetalen Gehirn im Normalfall und bei MLD ist Gegenstand dieser Arbeit.

Nach SVENNERHOLM und VANIER (16) ist der Sulfatidgehalt des normalen fetalen Gehirns zu niedrig, um eine exakte quantitative Bestimmung zu ermöglichen.

Bisher existiert keine Literatur über den sicheren biochemischen Nachweis von Sulfatiden im fetalen Gehirn im

Normalfall und bei MLD.
Im folgenden wird gezeigt, daß dieser Nachweis in beiden Fällen möglich ist, falls Ausgangsmaterial im Maßstab einiger Gramm fetalen Hirngewebes zur Verfügung steht: Mit Hilfe von Säulen- und anschließender Dünnschichtchromatographie kann die Sulfatid-Fraktion densitometrisch bestimmt werden.

2. Material und Methoden

Das fetale Hirngewebe stammte von 2 Feten mit MLD (21. und 22. Schwangerschaftswoche; pränatale, an den Feten bestätigte Diagnosen vgl. (8) und (15)) und 2 Kontrollfeten (19. und 20. Woche). Durch die Formalinfixierung vereinfacht sich die chromatographische Abtrennung der Phospholipide von den formalinresistenten Sulfatiden.

2.1. Säulenchromatographische Gewinnung von Sulfatid aus Gehirnlipidextrakt bei MLD und Kontrolle

Die Vorschrift von MEHL und JATZKEWITZ (11) wurde wie folgt modifiziert:
2,5 g (Feuchtgewicht) fetales Gehirn (fixiert in 4%iger Formaldehydlösung) werden mit dem 20-fachen Volumen Chloroform : Methanol (2 : 1) (Chloroform zur Analyse, stabilisiert mit Ethanol, und Methanol zur Analyse, E. MERCK, Darmstadt) extrahiert:

1^{min} mit Ultra-Turrax Typ 18/2 (JANKE und KUNKEL KG, Staufen i.B.) Stufe 5 Homogenisieren bei Raumtemperatur, 30^{min} unter häufigem Schütteln Stehenlassen, Filtrieren. Der so entstandene Gesamtlipidextrakt wird unter Zusatz von 2 ml 1-Butanol (Vermeidung des Schäumens) zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wird in 4 ml Chloroform : Methanol (2 : 1) aufgenommen und auf eine Florisil-Säule (60 x 2 cm, gleiche Volumenteile trockenes Magnesiumtrisilicat reinst 100-200 mesh und 60-100 mesh, für Säulenchromatographie, SERVA, Heidelberg, 1 Stunde bei $100^{o}C$ aktiviert, äquilibriert in Chloroform : Methanol, 2 : 1) aufgetragen. Anschließend wird mit 500 ml Chloroform : Methanol (2 : 1) eluiert (dabei Abtrennung der Cholesterin-/Glykolipidfraktion von der Phospholipid-Fraktion). Das Eluat wird einrotiert, der Rückstand in 4 ml Chloroform : Methanol (5 : 1) aufgenommen und auf eine Florisil-Säule (30 x 1,5 cm, Florisil wie oben, jedoch äquilibriert in Chloroform) aufgetragen. Dann wird mit 200 ml Chloroform, anschließend mit 400 ml Chloroform : Methanol (5 : 1) und zuletzt mit 60 ml Chloroform : Methanol (2 : 1) eluiert. Bei der Elution mit Chloroform : Methanol (2 : 1) werden 5 ml-Fraktionen aufgefangen.

2.2. Dünnschichtchromatographische Analyse (DC)

Von jeder Fraktion werden 2 ml mit einem Fön eingetrocknet. Der vereinigte Rückstand von jeweils 3 Fraktionen wird dann auf eine DC-Fertigplatte Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 0,25 mm, E. MERCK, Darmstadt) aufgetragen und mit 1, 2 und 3 µg Sulfatid (Nonhydroxy-Fettsäure-Typ der Sulfatid-Fraktion des Gehirns einer spätinfantilen MLD, isoliert nach MEHL und JATZKEWITZ (11)) als Referenzen im System Chloroform : Methanol : Wasser (14 : 6 : 1) chromatographiert. Anschließend wird die Platte getrocknet und in waagrechter Stellung bis zur Transparenz mit Kägi-Miescher-Reagenz (490 ml Eisessig + 10 ml konzentrierte Schwefelsäure + 3 ml Anisaldehyd = 4-Methoxybenzaldehyd, E. MERCK, Darmstadt) besprüht. Die Platte wird im Luftstrom gelagert, bis keine Flüssigkeit mehr auf ihr steht. Dann wird sie 15^{min} bei $120^{\circ}C$ im Trockenschrank erhitzt. Das Sulfatid erscheint als dunkelgrüner Fleck auf weißem Untergrund. Für die Färbung ist vor allem die Galaktose verantwortlich.

2.3. Densitometrie

Die Platten werden nach der Vorschrift von HARZER et al. (7) in der Modifikation von HARZER und BENZ (6) densitometriert.

2.4. Metachromasie-Test

Ein Aliquot der Sulfatid-haltigen Säulenfraktion (ca. 10 µg) wird auf einer Kieselgel 60-Platte im System Chloroform : Methanol : Wasser (14 : 6 : 1) chromatographiert. Die Platte wird mit Wasser angesprüht, bis der Substanzfleck sichtbar wird. Er wird ausgekratzt und das Sulfatid mit Chloroform : Methanol (2 : 1) extrahiert. Der Extrakt wird auf Filtrierpapier pipettiert und mit dem Fön getrocknet. Anschließend wird ein Tropfen N,N-Diäthyl-Pseudoisocyaninchlorid-Lösung (1 mg/10 ml Wasser, reinst, chromatographisch einheitlich, SERVA, Heidelberg) auf die eingetrocknete Substanz gegeben. Ebenso wird mit einem entsprechend vorbereiteten Kieselgel-Leerwert verfahren.

2.5. Cerebrosid-Nachweis

Zum Nachweis der Cerebroside werden der Rückstand aus 60 ml Chloroform : Methanol (5 : 1)-Eluat zusammen mit authentischem Cerebrosid aus fetalem Gehirn (ca. 2 µg) und einem Aliquot eines Lipidextraktes aus postnatalem MLD-Hirn auf eine 30 min bei 100 °C aktivierte Kieselgel 60-Platte aufgetragen und im System Chloroform : Methanol : Wasser (14 : 6 : 1) chromatographiert. Dann wird mit Kägi-Miescher-Reagenz wie unter 2.2. beschrieben angefärbt.

2.6. Cerebrosid- und Sulfatid-Hydrolyse

Ca. 10 µg der Cerebrosid-Fraktion werden 15^{min}, ca. 10 µg der Sulfatid-Fraktion 30^{min} und der Rückstand eines Gemisches aus je 10 µl einer gesättigten, ethanolischen Lösung von Glukose und Galaktose 15^{min} lang mit 100 µl Salzsäure (min. 32%, zur Analyse) bei Raumtemperatur hydrolysiert. Die Salzsäure wird anschließend mit Aceton verblasen, der Rückstand wird in Ethanol aufgenommen und zusammen mit je 10 µl einer gesättigten, ethanolischen Lösung von Glukose und Galaktose auf eine DC-Fertigplatte Kieselgel 60 aufgetragen. Dann wird im System Chloroform : Methanol : Wasser (14 : 6 : 1) chromatographiert und mit Kägi-Miescher-Reagenz angefärbt.

3. Ergebnisse

3.1. Säulenchromatographische Gewinnung von Sulfatid aus Gehirnlipidextrakt

Es wird eine Methode angegeben, mit der Sulfatide aus fetalem Gehirn darstellbar sind. Nach Abtrennung der Phospholipide an einer 1. Florisil-Säule erscheinen bei weiterer Fraktionierung des Eluats an einer 2. Florisil-Säule im Eluat mit Chloroform Cholesterin und andere hydrophobe Komponenten, im Eluat mit Chloroform : Methanol (5 : 1) Galakto-

cerebroside (s. 3.5.) und im Eluat mit Chloroform : Methanol (2 : 1) die Sulfatide. Die dünnschicht-chromatographische Analyse (s. 3.2.) zeigt einen Peak in den Fraktionen zwischen 35 und 75 ml dieses Eluats ohne direkt nachweisbare Verunreinigungen durch zusätzliche Substanzen (Abb. 2).

3.2. Dünnschichtchromatographische Analyse (Abb. 2)

Auf der DC-Platte erscheint im Vergleich zu den Referenzen ein dunkelgrüner Sulfatid-Doppelfleck (R_f-Werte 0,61 und 0,57), dessen hydrophilere Komponente einen etwas kleineren R_f-Wert hat als der entsprechende Fleck aus postnatalem Gehirn (0,57 gegenüber 0,58), und die auffälligerweise gegenüber der 0,61-Komponente eine wesentlich größere Menge (s. 3.3.) zeigt. Dies gilt für alle untersuchten Feten.

3.3. Densitometrie

Die densitometrische Auswertung der DC-Platten auf Sulfatide zusammen mit kalibrierten Tests (s. Methodik) ergibt für den Fet 1 mit MLD 3,8, für den Fet 2 mit MLD 2,8 und für die Kontrolle (Material der Kontrollfeten war gemischt, da sonst nicht ausreichend) 4,0 µg Sulfatide/ g Gehirn. Dies sind bei den anzunehmenden Fehlerbreiten keine signifikanten Unterschiede. Als Verhältnis zwischen den 0,61- und

0,57-Komponenten der Sulfatide (s. 3.2.) ergab sich 1 : 5 (zum Vergleich aus postnatalem Gehirn: ca. 1 : 1). In die Berechnung der angegebenen Konzentrationen ging die Summe der Komponenten ein (vgl. Abb. 2 Bahn 9).

3.4. Metachromasie-Reaktion

Im Gegensatz zum Leerwert, bei dem die lachsrote Färbung des N,N-Diäthyl-Pseudoisocyaninchlorids sich nicht änderte, trat bei der Reaktion mit den aus der Dünnschichtplatte isolierten Sulfatiden (beide Komponenten nach 3.2. zusammen) der Feten die typische violette (E_{583}) Metachromasie auf.

3.5. Cerebrosid-Nachweis

Die Auswertung von DC-Platten, auf denen zusätzlich zu den fetalen Sulfatiden Chloroform : Methanol (5 : 1)-Eluat (s. 3.1.) chromatographiert wurde, ergab, daß Galaktocerebroside (vgl. 3.6.) im fetalen Gehirn eine etwa 3,5mal höhere Konzentration haben als Sulfatide. Für die Densitometrie wurden authentische Referenz-Cerebroside herangezogen. Die fetalen Cerebroside erschienen als Doppelfleck (Komponentenverhältnis hier ca. 1 : 1) mit etwas höherem R_f-Wert (0,79) als postnatale Cerebroside (0,76).

3.6. Cerebrosid- und Sulfatid-Hydrolyse

3.6.1. Hydrolyse der Cerebroside

Auf der DC-Platte erschien nach saurer Hydrolyse des Chloroform : Methanol (5 : 1)-Eluats (3.1.) außer noch nicht hydrolysiertem Cerebrosid ein Fleck, der die gleiche Farbe und den gleichen R_f-Wert hatte wie Galaktose. Ferner sah man einen grünen Fleck mit kleinerem R_f-Wert (Galaktose-Isomer?, vgl. 3.6.3.).

3.6.2. Hydrolyse der Sulfatide

Nach Hydrolyse der Sulfatid-Hauptfraktion des Chloroform : Methanol (2 : 1)-Eluats (3.1.) entstand ein Cerebrosid-Doppelfleck mit genau demselben R_f-Wert wie ihn die fetalen Cerebroside (3.5.) zeigten, jedoch erwartungsgemäß jetzt mit dem Komponenten-Verhältnis 1 : 5, wie es auch der gleichzeitig sichtbare, noch nicht hydrolysierte Anteil (80%) der fetalen Sulfatide wiederum zeigte (vgl. 3.2. und 3.3.). Galaktose-3-Sulfat bzw. Galaktose waren - möglicherweise wegen Überlagerung durch einen Salzfleck und/oder zu geringer Konzentration - nach der Hydrolyse nicht nachweisbar.

3.6.3. Hydrolyse der Glukose- und der Galaktose-Referenzen

Bei Galaktose entstand ein zusätzlicher grüner Fleck, welcher zu jenem Fleck korrespondierte, der einen kleineren R_f-Wert als Galaktose selbst nach Hydrolyse der Cerebroside hatte (vgl. 3.6.1.). Möglicherweise handelte es sich um ein Salzsäure-bedingtes Umwandlungsprodukt von Galaktose. Bei Glukose entstanden keine zusätzlichen Flecken.

4. Diskussion

Bei der Beschäftigung mit der MLD im fetalen Stadium, also mit einer Entmarkungskrankheit zu einem ganz frühen Zeitpunkt der Bemarkung, tauchten in Bezug auf die Sulfatide als pathogenetisch wichtigem Substrat folgende Fragen auf:

1. Kommen im Gehirn von Feten im Alter von ca. 20 Wochen (um diese Zeit werden Schwangerschaften nach positiver Pränataldiagnose z.B. von Stoffwechseldefekten meist unterbrochen) bereits Sulfatide vor und - wenn dies der Fall ist - in welcher Konzentration?
2. Sind die Sulfatide zu dieser Zeit bei MLD infolge des genetischen Blocks im Sulfatidabbau bereits vermehrt?

Diese Fragen waren aus der Literatur nicht zu

beantworten, sondern führten zunächst zu einer weiteren Frage:

3. Ist neben den Sulfatiden die andere myelintypische Galaktolipidfraktion, die der Cerebroside (Sulfatide vermindert um Sulfat) ebenfalls schon nachweisbar?

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit können die Fragen 1 und 2 folgendermaßen beantwortet werden: Bei 19 bis 22 Wochen alten Feten ist eine geringe Menge von 3 - 4 µg Sulfatiden je g Gehirn zu bestimmen. Diese Menge ist bei MLD-Feten nicht erkennbar erhöht (Stadium vor neuraler Lipidspeicherung, s. unten). Für die Identifizierung der Sulfatide in der geringen Konzentration wurden folgende Kriterien herangezogen (dünnschichtchromatographische Analyse):

1. Sehr ähnlicher R_f-Wert im Vergleich zu authentischen Referenzsubstanzen.
2. Identisches Anfärbeverhalten (typisches "Glykolipid-Grün" mit Anisaldehyd-Reagenz) von Probe und Referenzen.
3. Metachromasie-Reaktion mit Pseudoisocyanin (Hinweis auf Sulfatgehalt).
4. Freisetzung von Galaktocerebrosid nach saurer Hydrolyse.

Weitere Strukturbeweise waren mit der geringen Sulfatidmenge nicht möglich, jedoch sind die angeführten insgesamt schlüssiger als die in der Literatur zu findenden Kriterien der Sulfatidbestimmung im frühfetalen Gehirn.

Daher ist es nicht erstaunlich, wenn in der Literatur meist inkorrekte Bestimmungen berichtet wurden:

1. HARZER et al. (8) gelang offenbar durch alleinige Dünnschichtchromatographie des Lipidextrakts aus unfixiertem Gehirn keine vollständige Abtrennung der Sulfatide, und sie bestimmten eine überlagernde Substanz mit, wodurch sie auf 5 - 20fach zu hohe Sulfatid-Werte für einen 22 Wochen alten MLD-Fet im Vergleich zu den hier vorgelegten Werten kamen.
2. PODUSLO et al. (13) begnügten sich in wenig gereinigten Fraktionen mit einer quantitativen Metachromasie-Reaktion (Farbstoff Azur A), die mit verschiedenen Polyanionen kreuzreagiert, als "Sulfatidbestimmung" und erhielten um den Faktor ca. 100 zu hohe Werte bei einem 20 Wochen alten MLD-Feten.
3. LEROY et al. (10) isolierten die Sulfatide aus einem viel älteren Feten mit MLD (1350 g, 42 cm), der für die Fragestellung dieser Arbeit weniger interessant ist, und bestimmten sie mit einem Orcin-Schwefelsäure-Reagenz. Der berichtete Wert von 46 µg Sulfatiden je mg Gesamtlipid (umgerechnet: ca. 2,5 mg Sulfatid je g Hirn-Feuchtgewicht) dürfte auch für den älteren Feten zu hoch sein: Die Autoren finden bereits in ihrem Kontrollfall (Neugeborenes) den Quotienten aus Sulfatid- und Cerebrosidgehalt größer als 1. Nach der Literatur (3) beträgt der normale Quotient 1 : 4 im postnatalen, nach dieser Arbeit

(s. 3.5.) beträgt er 1 : 3,5 im frühen pränatalen Stadium. Offenbar messen die Autoren den Sulfatid-Gehalt durchweg zu hoch.

4. WIESMANN et al. (17) untersuchten das Gehirn eines 23 Wochen alten Feten mit MLD dünnschichtchromatographisch auf Sulfatide und Cerebroside. Die Sulfatide konnten offenbar nicht, die Cerebroside in erniedrigter Konzentration nachgewiesen werden (keine Zahlenwerte). Die Autoren schlossen, daß die Syntheserate der Sulfatide im fetalen menschlichen Gehirn nicht hoch ist und ein blockierter Sulfatid-Abbau nicht zu einer ausgeprägten Speicherung führt.

Einen ähnlichen Schluß möchte auch der Verfasser der vorliegenden Arbeit aus den von ihm erhaltenen, genaueren Ergebnissen ziehen.

Im frühen Fetalalter ganz zu Beginn der Myelinisierung werden zwar im Gehirn bereits Sulfatide synthetisiert, der Spiegel von 3 - 4 µg je g Feuchtgewicht wird jedoch offenbar noch nicht durch den Sulfatid-Abbau (ASA-Aktivität) kontrolliert, denn sonst müßte es bei defekter ASA-Aktivität in den MLD-Feten zu einem erhöhten Sulfatidspiegel im Gehirn kommen, was jedoch nach den eigenen Messungen eben nicht der Fall ist. In früheren Arbeiten (8, 14, 15) wurde darauf hingewiesen, daß dagegen in der Niere in dem frühen Fetal-Stadium bei MLD durchaus ein deutlich erhöhter Sulfatidspiegel infolge des Abbaudefekts vorliegt. Die MLD imponiert in diesem Stadium

also noch als Nieren- (und Leber-) Sulfatid-Speicherkrankheit und nicht als Neurolipidose. Dies ist folgendermaßen zu erklären: In der Niere und Leber haben die Sulfatide gegenüber der neuralen, mit der Markscheide zusammenhängenden Funktion eine völlig verschiedene onto- (und phylo-?) genetisch früher einsetzende Aufgabe, zu der offenbar ein katabolisch schon streng kontrollierter Sulfatidspiegel gehört:

ZALC et al. (18) fanden mit Hilfe von immunologischen Methoden, daß Sulfatide in der Kaninchenniere in die passive Diffusion von NaCl aus dem Tubuluslumen in den interstitiellen Raum involviert sind. Nach ihren Ergebnissen ist Sulfatid kein Element der Na^+/K^+-abhängigen ATPase.

ZAMBRANO et al. (19) dagegen berichteten: Der aktive Na-Efflux menschlicher ^{22}Na-markierter Erythrozyten wird durch ASA-katalysierte Sulfatid-Hydrolyse vermindert. Dies legt den Schluß nahe, daß Sulfatid als Lipid-Cofaktor an der als Natriumpumpe fungierenden Ouabain-sensitiven Na^+/K^+-abhängigen ATPase beteiligt ist.

Zurückkehrend zu den Sulfatiden aus fetalem Gehirn ist noch auf eine Besonderheit einzugehen, die in Abb. 2 erkennbar ist. Der Doppelfleck isolierter Fetalhirn-Sulfatide zeigt die eine, näher zur Startposition gelegene (also untere) Komponente stark im Übergewicht (vgl. 3.2.). Dieser Befund - er gilt für alle untersuchten Feten - weicht von den postnatalen Verhältnissen

auffällig ab, zu denen ein ungefähres Gleichgewicht der beiden Sulfatid-Komponenten gehört. Die bei den Feten vorherrschende, untere Komponente entspricht im Analogieschluss zu den postnatalen Verhältnissen dem Hydroxy-Fettsäure-Typ der Sulfatide. Vielleicht wird deswegen, weil das frühfetale Gehirn noch nicht allzu lipidreich ist, diese etwas weniger lipophile untere Komponente der Sulfatide bevorzugt gebildet.

Eingangs wurde als 3. der aufgeworfenen Fragen die nach den Galaktocerebrosiden im frühfetalen Gehirn gestellt. In den Ergebnissen wurde über einen den Sulfatid-Gehalt um den Faktor 3,5 übersteigenden Galaktocerebrosid-Gehalt berichtet. Der Doppelfleck der Galaktocerebroside (Haupt-Myelinlipide) zeigte nun nicht die für die Sulfatide beschriebene Prävalenz der weniger lipophilen unteren Komponente, obwohl Sulfatide und Galaktocerebroside metabolisch eng verknüpft sind (Sulfatide entstehen durch Sulfatübertragung auf Cerebroside). Möglicherweise ist diese Verknüpfung im früh-fetalen Stadium etwas anders reguliert. Das Mengenverhältnis Sulfatide/Cerebroside entspricht mit 1 : 3,5 jedoch schon weitgehend den postnatalen Verhältnissen (s. oben), so daß insgesamt der vorsichtige Schluß erlaubt sein mag, im frühfetalen Stadium würden Sulfatide und Galaktocerebroside in ähnlicher Weise wie für reifes Myelin in ultrastrukturell noch negative Myelin-Vorläufer eingebaut. Auch wenn morphologisch in so frühen Stadien

im Großhirn noch keine Myelinisierung feststellbar ist (12), können bereits auf diese bezogene Substrukturen vorhanden sein und entsprechende Biosyntheseschritte ablaufen. Aber auch die Vorstellung, Sulfatid und Galaktocerebrosid hätten im frühfetalen Gehirn noch weniger eng korrelierte Funktionen als in der reifen Marksubstanz, ist nicht von der Hand zu weisen.
Abschließend darf die Behauptung von SVENNERHOLM und VANIER (16), die frühfetalen Konzentrationen von Sulfatid und Galaktocerebrosid im Gehirn seien für eine exakte quantitative Bestimmung zu gering, als widerlegt betrachtet werden. Die quantitative Analyse dieser Galaktolipide ist auch im frühfetalen Gehirn möglich und erlaubt gewisse Einblicke in der Myelinisierung vorausgehende oder diese einleitende Stoffwechselvorgänge.

Diese Arbeit wurde in der Zeit von April 1978 bis Juli 1982 mit Unterbrechungen durch 1. - 3. Staatsexamen und Praktisches Jahr im Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen durchgeführt.
Den Herren Professoren Dr. Peiffer und Dr. Harzer möchte ich für die Arbeitsmöglichkeit, die Betreuung - die durch die notwendigen Unterbrechungen sicher erschwert war - und die kritische Beurteilung danken.

5. Zusammenfassung

Aus Gehirn von 2 Feten (21. und 22. Schwangerschaftswoche) mit pränatal diagnostizierter Metachromatischer Leukodystrophie (MLD, Sulfatid-Lipidose) und von 2 Kontrollfeten (19. und 20. Schwangerschaftswoche) wurden mit Hilfe von Säulen- und Dünnschichtchromatographie Sulfatide isoliert. In allen Feten traten Sulfatide schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Myelinisierung in Spuren auf (2,8 - 4,0 µg/ g formalinfixiertes Gehirn). Eine Speicherung von Sulfatiden war bei MLD zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht feststellbar. Im Gegensatz zum postnatalen Stadium war pränatal sowohl bei MLD als auch im Normalfall die mehr polare Komponente der Sulfatid-Fraktion (Hydroxy-Fettsäure-Typ) vorherrschend.
Von den übrigen Myelinlipiden war außerdem die Galaktocerebrosid-Fraktion bereits nachweisbar. Ihre Menge übertraf diejenige der Sulfatide um ca. das 3,5fache.
Die Befunde lieferten zum erstenmal genauere Angaben über den Gehalt der myelintypischen Galaktolipide menschlicher Feten aus dem 2. Trimenon.

6. Literaturverzeichnis

(1) AUSTIN, J.H.: Metachromatic Sulfatides in Cerebral White Matter and Kidney.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 361 - 364 (1959)

(2) BENZ, H.U. and K. HARZER: Metachromatic Reaction of Pseudoisocyanine with Sulfatides in Metachromatic Leukodystrophy (MLD) I. Technique of Histochemical Staining.
Acta neuropath. (Berl.) 27, 177 - 180 (1974)

(3) DULANEY, J.T. and H.W. MOSER: Sulfatide Lipidosis: Metachromatic Leukodystrophy. In: STANBURY, J.B., J.B. WYNGAARDEN and D.S. FREDRICKSON (ed.): The metabolic basis of inherited disease.
(McGraw-Hill Book Company: New York, 4th edit. 1978) 770 - 809

(4) HARZER, K.: Pränataldiagnostik erblicher Stoffwechselkrankheiten.
Monatskurse für die ärztliche Fortbildung 30, Nr. 3 102 - 106 (1980)

(5) HARZER, K. und H.U. BENZ: Quantitative Metachromasie mit Pseudoisocyanin: Eine neue Methode zur Bestimmung von Sulfatiden sowie

ihre Anwendung bei der Diagnose der Metachromatischen Leukodystrophie (Sulfatid-Lipidose).
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11. Jg., 471 - 475 (1973)

(6) HARZER, K. and H.U. BENZ: Deficiency of Lactosyl Sulfatide Sulfatase in Metachromatic Leucodystrophy (Sulfatidosis).
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 744 - 748 (1974)

(7) HARZER, K., W. WÄSSLE, K. SANDHOFF und H. JATZKEWITZ: Densitometrische Mikrobestimmung von Lipiden nach Dünnschicht-Chromatographie des Gesamtlipidextrakts.
Z. Anal. Chem. 243, 527 - 536 (1968)

(8) HARZER, K., V. ZAHN, S. STENGEL-RUTKOWSKI und E.-O. GLEY: Pränatale Diagnose der metachromatischen Leukodystrophie.
Dtsch. med. Wschr. 100, 951 - 953 (1975)

(9) KNÖRR, K.: Die Erkennung von Entwicklungsstörungen in der frühen Schwangerschaft durch Fruchtwasseruntersuchung.
Klin. Wschr. 55, 1191 - 1196 (1977)

(10) LEROY, J.G., A.F. VAN ELSEN, J.-J. MARTIN, J.E. DUMON, A.E. HULET, S. OKADA and C. NAVARRO: Infantile Metachromatic Leukodystrophy Confirmation of a Prenatal Diagnosis. N. Engl. J. Med. 288, 1365 - 1369 (1973)

(11) MEHL, E. und H. JATZKEWITZ: Säulenchromatographische Gewinnung von Cerebrosidtypen aus Gehirnlipoidextrakt. Naturwissenschaften 50, 227 - 229 (1963)

(12) MEIER, C. and A. BISCHOFF: Sequence of Morphological Alterations in the Nervous System of Metachromatic Leucodystrophy Light- and Electronmicroscopic Observations in the Central and Peripheral Nervous System in a Prenatally Diagnosed Foetus of 22-Weeks. Acta neuropath. (Berl.) 36, 369 - 379 (1976)

(13) PODUSLO, S.E., G. TENNEKOON, D. PRICE, K. MILLER and G.M. MCKHANN: Fetal Metachromatic Leukodystrophy: Pathology, Biochemistry and a Study of in vitro Enzyme Replacement in CNS Tissue. J. Neuropath. Exp. Neurol. 35, 622 - 632 (1976)

(14) SCHLIPF, T.: Lipidchemische Untersuchungen an Feten mit Sphingolipidosen.
Dissertation, Universität Tübingen, 1978

(15) SUCHLANDT, G., W. SCHLOTE und K. HARZER: Ultrastrukturelle Befunde bei 9 Feten nach pränataler Diagnose von Neurolipidosen.
Arch Psychiatr Nervenkr, in Vorbereitung

(16) SVENNERHOLM, L. and M.T. VANIER: The Distribution of Lipids in the Human Nervous System. II. Lipid Composition of Human Fetal and Infant Brain.
Brain Research 47, 457 - 468 (1972)

(17) WIESMANN, U.N., C. MEIER, M.A. SPYCHER, W. SCHMID, A. BISCHOFF, E. GAUTIER and N. HERSCHKOWITZ: Prenatal metachromatic leukodystrophy.
Helv. paediat. Acta 30, 31 - 42 (1975)

(18) ZALC, B., J.J. HELWIG, M.S. GHANDOUR and L. SARLIEVE: Sulfatide in the Kidney: How is this Lipid involved in Sodium Chloride Transport?
FEBS Letters 92, 92 - 96 (1978)

(19) ZAMBRANO, F., M. MORALES, N. FUENTES and M. ROJAS: Sulfatide Role in the Sodium Pump.
J. Membrane Biol. 63, 71 - 75 (1981)

Legenden zu den Abbildungen

Abbildung 1: Schema zur Sulfatid-Biosynthese

Abbildung 2: Dünnschichtchromatogramm von Sulfatiden aus fetalem und postnatalem Gehirn sowie von den Sulfatid-Flecken densitometrisch erhaltene Kurven

Bahn 2: 2 µg Referenz-Sulfatid

Bahn 3: 3 µg Referenz-Sulfatid

Bahn A: Sulfatide aus 5 µl 5%igem Chloroform : Methanol (2 : 1)-Gehirnlipidextrakt einer spätinfantilen Metachromatischen Leukodystrophie

Bahn 9: aus fetalem Kontroll-Gehirn isolierte Sulfatide (Hauptfraktion)

ABBILDUNG 1

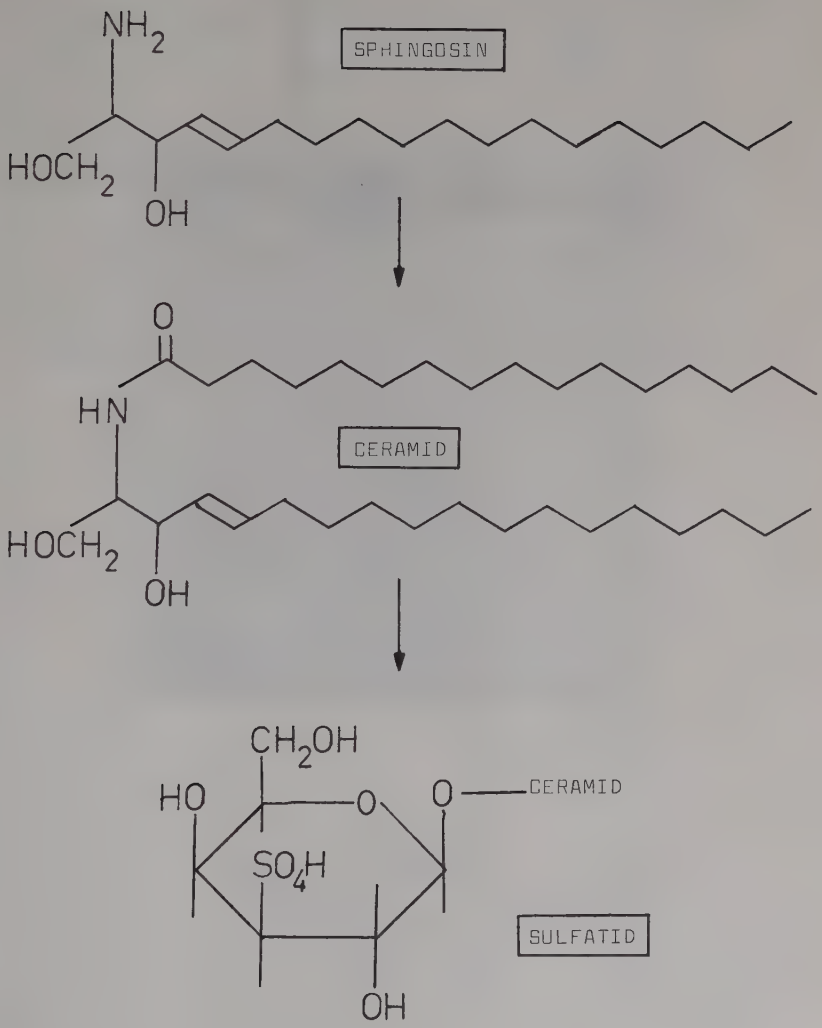
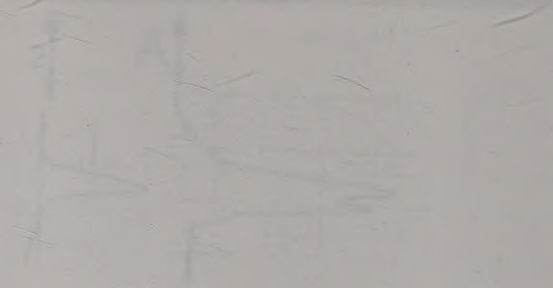

NH2
SPHINGOSIN
HOCH2
OH
O
HN
CERAMID
HOCH2
OH
CH2OH
HO
O
O
CERAMID
SO4H
SULFATID
OH

ABBILDUNG 2

LEBENSLAUF

Am 18.3.1952 wurde ich, Wolfgang Baier, als Sohn des Heinrich Baier und der Renate Baier, geb. Kruse in Hohenlimburg geboren. Von 1958 – 1962 besuchte ich die Volksschule, von 1962 – 1970 das Städt. Gymnasium in Hohenlimburg. Nach dem Abitur im Juni 1970 begann ich im WS 70/71 mit dem Studium der Biochemie an der Universität Tübingen. Im September 1971 bestand ich den ersten und im Oktober 1973 den zweiten Teil der Diplom - Vorprüfung. Das SS 74 und das WS 74/75 verbrachte ich an der Universität München. Wieder in Tübingen, begann ich im WS 75/76 mit dem Studium der Medizin. Im Mai 1976 bestand ich die Diplom - Hauptprüfung, und nach Abschluß der Diplomarbeit wurde mir im Juni 1977 der Grad " Diplom - Biochemiker " verliehen. Im März 1978 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, im März 1979 den ersten, im März 1981 den zweiten und am 26. 4. 1982 den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Am 17.5.1982 wurde mir die Approbation als Arzt verliehen.